

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤（C）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21510210

研究課題名（和文） 統合ゲノム解析による植物病害抵抗性反応のシステム応答制御機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of plant defense system through integrative genomic analysis

研究代表者

岩城 俊雄 (IWAKI TOSHIO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：20295728

研究成果の概要（和文）：

新たな耐病性育種戦略に貢献することを目指し、ナス科植物栽培に多大な被害を与えている青枯病菌の感染によって見られる植物葉の葉脈成長の停止と導管部分の特異的木化についての分子メカニズムを解明することを目的として研究を行った。病害抵抗性と接種菌株の関係より、抵抗性反応について2つの異なる機構が見いだされ、菌体増殖を阻害する抗菌性化合物と感染部位に蓄積し葉脈伸長停止に関与する化合物の産生が確認された。

研究成果の概要（英文）：

Bacterial wilt is caused by a soil borne pathogen. When infected with incompatible strain into plant leaves, development of the leaf trachea were inhibited and UV fluorescence microscopy of infected sections showed the accumulation of fluorescence substances around the leaf vein. In this research, we studied changes in metabolic profiles at the infection sites of eggplants challenged by during the infection of an incompatible-strain, through the metabolome analyses. From the relation between inoculum strain and disease resistance, two different mechanisms are found for the resistance, 1); the production of compounds involved in the elongation arrest vein to accumulate at the site of infection, and 2); antimicrobial compound that inhibits the growth of bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：応用ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：メタボロミクス・二次代謝・代謝工学・ストレス応答・病害応答

1. 研究開始当初の背景 ゲノム解析の重要な成果の一つは、様々な代謝経路に関わる遺

伝子群の相互作用を俯瞰的に考察することを可能にした点にある。例えば、DNA アレ

イを用いた網羅的遺伝子発現解析やメタボロミクスなどの研究手法は、従来の分子遺伝学的手法では困難であった複雑なシグナル伝達経路や病害抵抗性発揮など、個体レベルの生命反応に対する詳細な解析を可能にした。しかしながら、モデル植物のゲノム解析結果を一般的な実用植物（作物）育種へと積極的に応用するには、まだまだ距離感があることは否めない。

一方、トマトをはじめジャガイモやナスなど重要作物が多数含まれるナス科植物に関しては、トマトゲノム解析が開始されたのみならず、すでに DNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析が可能である。特に、ナス科植物の病理学的研究にはモデル植物であるシロイヌナズナに比べて大きな蓄積がある。病害抵抗性反応機構のように百個以上の多数の遺伝子が時間的・空間的に複雑に関わる場合には、トランスクリプトミクスやメタボロミクス等の網羅的解析が重要な役割を果たすと考えられる。

青枯病は土壌伝染性の病害であり、*Ralstonia solanacearum* による植物体への感染によって引き起こされる。*R. solanacearum* は熱帯、亜熱帯、温帯地域を中心に世界各地に分布し、ナス、トマト、ジャガイモ等のナス科を中心に、200 余種の植物に感染、被害を与えることから、農業生産上の大きな問題となっている。*R. solanacearum* は通常、宿主植物の根部表面に定着し、傷口および根の皮層より侵入する。本菌は細胞間隙で増殖した後、導管を通じて全身に移行し、増殖する。*R. solanacearum* は通導管組織中で菌体外多糖や植物細胞壁分解酵素を生産する。その結果、木部組織の水分通道機能が弱められ、感染植物は萎凋症状を呈する。*R. solanacearum* は、他のグラム陰性の植物病原細菌と同様にタイプ III 分泌装置 (T3SS) を有しており、T3SS を介したタイプ III エフェクター (T3SEs) の宿主細胞内への分泌が病原性の要因であると考えられている。そのため、T3SS の構成タンパク質や T3SEs をコードしている *hrp* 遺伝子群の変異株は宿主に対する病原性を失う。一方、植物の病害抵抗性には、静的抵抗性と動的抵抗性の2種類の抵抗性が存在する。動的抵抗性は PAMPs-triggered immunity (PTI) と effector-triggered immunity (ETI) の2つに大別できる。PTI は、植物のエリシター認識タンパク質が、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) と呼ばれる非特異的エリシターを認識することで誘導される。ETI は、病原体の T3SS を介して分泌される T3SEs が、植物の病害抵抗性タンパク質 (R タンパク質) に認識されることで誘導される。病原体の T3SEs が植物体に認識されるとき、両者は非親和性の関係にあり、過敏感反応 (HR) な

どの抵抗性が誘導される。病原体の T3SEs が植物体に認識されないとき、両者は親和性の関係にあり、植物は ETI 抵抗性を発揮できず、病原菌の感染が成立する。これまで、ナスなどの栽培作物において青枯病抵抗性品種が多く開発されてきているが、地上部よりの感染や台木の抵抗性崩壊など抵抗性は万能ではない。先に述べたように、植物体に対する青枯病菌の感染メカニズムについてはゲノム解析を含めて詳細な分子生物学的、分子遺伝学的研究が進んでいる。しかし、宿主植物の抵抗性反応については数百の遺伝子が時間的・空間的に関わるため分子生物学的、生化学的研究はほとんど進んでいない。そこで本研究では青枯病菌感染時のナス植物体の防御反応機構についてメタボロミクスの手法を適用することで新たな知見を得ることを目的とした。

申請者らは、青枯病の研究過程で、台木用ナス植物 (抵抗性品種) に対して非親和性菌株を接種すると、葉脈成長停止と導管部分の木化誘導が特異的に起こることを確認した。これは、病害抵抗性反応として誘導されるケイ皮酸モノリグノール合成経路の特異的活性化の関与を示唆しており、耐病性育種戦略の新たな展開が可能と考えられた。

## 2. 研究の目的

・*R. solanacearum* 非親和性菌の感染による葉脈成長停止・導管部分の木化の誘導には、ケイ皮酸モノリグノール合成経路関連遺伝子の特異的な転写活性化とそれに対応する代謝産物蓄積が起こると考えられ、蓄積化合物の同定を行う。

・病害抵抗反応時に機能するケイ皮酸モノリグノール代謝経路関連遺伝子の発現制御ネットワークを明らかにする。

・明らかになった病害耐性反応に関わる遺伝子の全長 cDNA の取得、さらに過剰発現体あるいは発現抑制変異株の作製実験を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 感染実験。青枯病原菌感染実験には、台木用ナスに対して病原性 (vir) の *R. solanacearum* BK1002 株、過敏感反応 (HR) を誘起する非病原性 (avi) の RS1002 株およびそのコントロールとして、*hrp* 遺伝子を欠損させた RS1016 株を使用する。播種後約 3 週目のナス本葉を、菌体希釈液 ( $5 \times 10^8$  cfu/ml) を塗布したハサミで一部切断することによって感染させる。非病原性 RS1002 株感染葉において観察された葉脈の伸長停止部位をサンプリングする。

(2) 病原抵抗性反応解析。サンプル部位に蓄積することが確認されたケイ皮酸モノリグノール合成経路中間体と予想される蛍光物質を薄層クロマトグラフィーによって部

分精製し、高速液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-ESI-TOF/MS) によって構造解析する。一方、非病原性菌株の感染部位において、新奇な抗菌性物質の蓄積が前年度に確認された。その抗菌性物質について、単離・精製と構造解析を GC-MS を用いて行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、新たな耐病性育種戦略に貢献することを目指し、ナス科植物栽培に多大な被害を与えている青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) の非親和性菌株の感染によって見られる植物葉の葉脈成長の停止と導管部分の特異的木化についての分子メカニズムをメタボロミクスによる代謝産物動態解析によって解明することを目的として研究を行った。青枯病原菌感染実験には、ナスに対して病原性および非病原性の *R. solanacearum* 株およびそのコントロールとして、*hrp* 遺伝子を欠損させた株を用いた。本研究期間では病害抵抗性と接種菌株の関係より、抵抗性反応について2つの異なる機構が見いだされた。一つは、*hrp* 欠損株感染において、菌体増殖を阻害する抗菌性物質の蓄積を示す現象が得られた。この化合物の同定のためにペーパーディスク法によって抗菌活性を評価した (図1)。さらに、抗菌性化合物

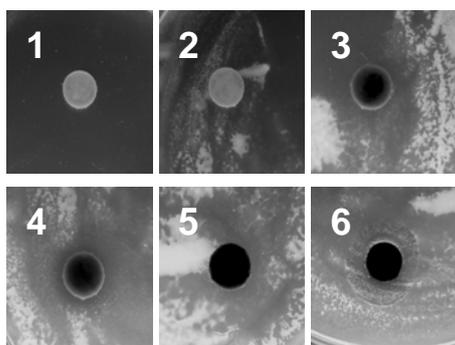


図1. ペーパーディスク法による抗菌性試験  
1: カナマイシン 25 mg,  
2: 80%メタノール, 3: 無処理葉抽出画分, 4: RS (*hrp*) 処理葉抽出画分, 5: RS (非病原性) 処理葉抽出画分, 6: BK (病原性) 処理葉抽出画分

物について TLC による部分精製を実施し、生成画分について LC-MS による構造解析を進めている。このような植物体内に蓄積される抗菌性物質について、ナス科植物における報告は非常に少なく、病害抵抗性品種作出の有力なツールとなることが期待できる。

2つ目は、非病原性菌株における感染葉葉脈部分の伸長停止反応について、感染部位に特異的に蓄積する蛍光物質を確認した。現在、抽出画分について精製および構造推定を進

めている。LC-ESI-TOF/MS 分析では、ケイ皮酸モノリグノール経路中間体やフラボノイド類、アルカロイド類と思われるイオンが検出された (Fig. 6, Fig. 8)。ケイ皮酸モノリグノール経路中間体は、細胞壁の構成成分であるリグニンの前駆体であり、フラボノイド類やアルカロイド類はケイ皮酸モノリグノール経路中間体の誘導体で、抗菌性に関わる物質が多く含まれる。LC-ESI-TOF/MS 分析の結果から、主脈の伸長停止に、ケイ皮酸モノリグノール経路代謝の変動が関わり、病害抵抗性に関わる未知の遺伝子発現制御の存在が予想される。このような変動が見られた化合物の同定を進め、病害抵抗性に関わる代謝経路とその遺伝子を明らかにしていく予定である。さらに、抵抗性反応により蓄積される代謝中間体を分析するために、GC-MS によるノンターゲットメタボロミクスプラットフォームの構築を行い、メノール、およびクロロフォルム抽出物に対応する約100種の化合物について、同定・定量が可能な分析基盤を構築した。

ナス植物体において、抗菌性物質による抵抗性反応と、葉脈部分に感染時特異的に蓄積する物質による病原性菌体の移動抑制による抵抗性という、2つの抵抗性反応が明らかになった。今後その詳細を明らかにしていく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

なし

[学会発表] (計4件)

(1) 露口恵太郎, 岩城俊雄, 太田大策, 「ナス科植物体における *Ralstonia solanacearum* 感染時における抵抗性反応の解析」, 日本農芸化学会, 2011年3月24日, 京都

(2) T. Iwaki, S. Yasuda, Y. Ueki, T. Shimazaki, A. Kikuchi, K. N. Watanabe, Y. Ozeki, D. Ohta, Metabolome analyses for the safety assessment of transgenic potato tubers expressing Arabidopsis DREB1A transcription factor gene. , Pachifichem2010, 2010年12月18日, 米国

(3) 露口恵太郎, 岩城俊雄, 太田大策, 「*Ralstonia solanacearum* 感染時におけるナス科植物体のメタボローム解析」, 日本植物生理学会, 2010年3月20日, 熊本

(4) 岩城俊雄, 露口恵太郎, 太田大策, 「ナス科植物体の *Ralstonia solanacearum* 感染時におけるメタボロミクス」, 日本植物分子生物学会, 2009年7月31日, 神奈川

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

なし

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩城 俊雄 (IWAKI TOSHIO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：20295728

### (2) 研究分担者

太田 大策 (OHTA DAISAKU)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10305659

小川 拓水 (OGAWA TAKUMI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：00580367

### (3) 連携研究者

なし